

**PCT**WELTORGANISATION FÜR GEISTIGES EIGENTUM  
Internationales BüroINTERNATIONALE ANMELDUNG VERÖFFENTLICHT NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE  
INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS (PCT)

<b>(51) Internationale Patentklassifikation<sup>6</sup> :</b> <b>A61R 31/495, 31/445, 31/195, C07D 295/182, A61R 47/48</b>		<b>A2</b>	<b>(11) Internationale Veröffentlichungsnummer:</b> <b>WO 00/04954</b>
			<b>(43) Internationales Veröffentlichungsdatum:</b> 3. Februar 2000 (03.02.00)
<b>(21) Internationales Aktenzeichen:</b>	PCT/EP99/05145		
<b>(22) Internationales Anmeldedatum:</b>	20. Juli 1999 (20.07.99)		
<b>(30) Prioritätsdaten:</b> 98113519.7	20. Juli 1998 (20.07.98)	EP	
<b>(71) Anmelder</b> (für alle Bestimmungsstaaten ausser US): WILEX BIOTECHNOLOGY GMBH [DE/DE]; Grillparzer Strasse 10 B, D-81675 München (DE).			<b>(81) Bestimmungsstaaten:</b> AE, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, CA, CH, CN, CU, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MD, MG, MK, MN, MW, MX, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW, ARIPO Patent (GH, GM, KE, LS, MW, SD, SL, SZ, UG, ZW), eurasisches Patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), europäisches Patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), OAPI Patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).
<b>(72) Erfinder; und</b>			<b>Veröffentlicht</b>
<b>(75) Erfinder/Anmelder</b> (nur für US): WILHELM, Olaf [DE/DE]; Säbener Strasse 188, D-81545 München (DE). MAG-DOLEN, Viktor [US/DE]; Moosacherweg 3, D-85551 Kirchheim (DE). STÜRZEBECHER, Jörg [DE/DE]; Hubertusstrasse 38, D-99094 Erfurt (DE). FOEKENS, John [NL/NL]; Filosofentuin 35, NL-2908 XA Capelle a/d IJssel (NL). LUTZ, Verena [DE/DE]; Sankt-Wolfgangs-Platz 9F, D-81669 München (DE).			Ohne internationalen Recherchenbericht und erneut zu veröffentlichen nach Erhalt des Berichts.
<b>(74) Anwälte:</b> WEICKMANN, H. usw.; Kopernikusstrasse 9, D-81679 München (DE).			

**(54) Title:** NOVEL UROKINASE INHIBITORS**(54) Bezeichnung:** NEUE UROKINASE-INHIBITOREN**(57) Abstract**

The invention relates to the use of derivatives of 3-amidino-phenyl-alanine as urokinase inhibitors for treating malignant tumors and the formation of metastases thereof.

**(57) Zusammenfassung**

Die Erfindung betrifft die Verwendung von Derivaten des 3-Amidino-phenylalanins als Urokinase-Inhibitoren zur Behandlung von malignen Tumoren und der Metastasierung.

#### **LEDIGLICH ZUR INFORMATION**

Codes zur Identifizierung von PCT-Vertragsstaaten auf den Kopfbögen der Schriften, die internationale Anmeldungen gemäss dem PCT veröffentlichen.

<b>AL</b>	Albanien	<b>ES</b>	Spanien	<b>LS</b>	Lesotho	<b>SI</b>	Slowenien
<b>AM</b>	Armenien	<b>FI</b>	Finnland	<b>LT</b>	Litauen	<b>SK</b>	Slowakei
<b>AT</b>	Österreich	<b>FR</b>	Frankreich	<b>LU</b>	Luxemburg	<b>SN</b>	Senegal
<b>AU</b>	Australien	<b>GA</b>	Gabun	<b>LV</b>	Lettland	<b>SZ</b>	Swasiland
<b>AZ</b>	Aserbaidschan	<b>GB</b>	Vereinigtes Königreich	<b>MC</b>	Monaco	<b>TD</b>	Tschad
<b>BA</b>	Bosnien-Herzegowina	<b>GE</b>	Georgien	<b>MD</b>	Republik Moldau	<b>TG</b>	Togo
<b>BB</b>	Barbados	<b>GH</b>	Ghana	<b>MG</b>	Madagaskar	<b>TJ</b>	Tadschikistan
<b>BE</b>	Belgien	<b>GN</b>	Guinea	<b>MK</b>	Die ehemalige jugoslawische Republik Mazedonien	<b>TM</b>	Turkmenistan
<b>BF</b>	Burkina Faso	<b>GR</b>	Griechenland	<b>ML</b>	Mali	<b>TR</b>	Türkei
<b>BG</b>	Bulgarien	<b>HU</b>	Ungarn	<b>MN</b>	Mongolei	<b>TT</b>	Trinidad und Tobago
<b>BJ</b>	Benin	<b>IE</b>	Irland	<b>MR</b>	Maurenitanien	<b>UA</b>	Ukraine
<b>BR</b>	Brasilien	<b>IL</b>	Israel	<b>MW</b>	Malawi	<b>UG</b>	Uganda
<b>BY</b>	Belarus	<b>IS</b>	Island	<b>MX</b>	Mexiko	<b>US</b>	Vereinigte Staaten von Amerika
<b>CA</b>	Kanada	<b>IT</b>	Italien	<b>NE</b>	Niger	<b>UZ</b>	Usbekistan
<b>CF</b>	Zentralafrikanische Republik	<b>JP</b>	Japan	<b>NL</b>	Niederlande	<b>VN</b>	Vietnam
<b>CG</b>	Kongo	<b>KE</b>	Kenia	<b>NO</b>	Norwegen	<b>YU</b>	Jugoslawien
<b>CH</b>	Schweiz	<b>KG</b>	Kirgisistan	<b>NZ</b>	Neuseeland	<b>ZW</b>	Zimbabwe
<b>CI</b>	Côte d'Ivoire	<b>KP</b>	Demokratische Volksrepublik Korea	<b>PL</b>	Polen		
<b>CM</b>	Kamerun	<b>KR</b>	Republik Korea	<b>PT</b>	Portugal		
<b>CN</b>	China	<b>KZ</b>	Kasachstan	<b>RO</b>	Rumänien		
<b>CU</b>	Kuba	<b>LC</b>	St. Lucia	<b>RU</b>	Russische Föderation		
<b>CZ</b>	Tschechische Republik	<b>LI</b>	Liechtenstein	<b>SD</b>	Sudan		
<b>DE</b>	Deutschland	<b>LK</b>	Sri Lanka	<b>SE</b>	Schweden		
<b>DK</b>	Dänemark	<b>LR</b>	Liberia	<b>SG</b>	Singapur		
<b>EE</b>	Estland						

**Neue Urokinase-Inhibitoren****Beschreibung**

5

Die Erfindung betrifft die Verwendung von Derivaten des 3-Amidino-phenylalanins als Urokinase-Inhibitoren insbesondere zur Behandlung von malignen Tumoren und der Metastasierung bzw. als Mittel zum Targeting von Lymphzellen und zur Behandlung von Erkrankungen des Lymphgewebes, insbesondere von Lymphomen.

Die Fähigkeit solider Tumoren zur Ausbreitung und Metastasierung in umgebendes Gewebe korreliert mit dem Abbau bzw. Umbau der extrazellulären Matrix (Tumorstroma) in der Umgebung der Tumorzelle, bzw. mit deren Fähigkeit zur Durchdringung der Basalmembran. Obwohl die (patho)biochemischen Zusammenhänge noch nicht endgültig aufgeklärt sind, kommen dem Plasminogenaktivator Urokinase (uPA) und dem Urokinaserezeptor (uPAR) eine zentrale Bedeutung zu. uPA vermittelt die proteolytische Spaltung von Plasminogen zu Plasmin. Plasmin wiederum ist eine Protease mit breitem Wirkspktrum, die Komponenten der extrazellulären Matrix wie Fibrin, Fibronectin, Laminin und das Proteingerüst der Proteoglykane direkt abzubauen vermag. Außerdem kann Plasmin "latente" Metalloproteasen und das inaktive Proenzym von uPA, pro-uPA, aktivieren.

25 Tumorzellen und nichtmaligne Zellen des Tumorstromas synthetisieren und sezernieren das enzymatisch inaktive Proenzym pro-uPA. Proteasen wie z.B. Plasmin oder die Kathepsine B und L spalten pro-uPA durch limitierte Proteolyse zur aktiven Serinprotease HMW-uPA (HMW = high molecular weight). pro-uPA und die aktive Protease HMW-uPA binden an den Zelloberflächenrezeptor uPAR (CD87). Plasmin(ogen) bindet ebenfalls an spezifische Rezeptoren auf der Plasmamembran der Tumorzelle, wodurch eine Fokussierung und Amplifikation der Plasminogenaktivierung in der direkten Umgebung der

- 2 -

Tumorzelle erreicht wird. Invasiven Zellen ist somit die Möglichkeit gegeben, die extrazelluläre Matrix abzubauen, ohne sich der für eine gerichtete Bewegung notwendigen Unterlagen durch Proteolyse zu entziehen.

5 In verschiedenen zellbiologischen Studien konnte gezeigt werden, daß dem zellassoziierten Plasminogenaktivator-System innerhalb der kaskadenartigen Reaktionswege tumorassozierter Proteolysesysteme ein besonderer Stellenwert zukommt (Wilhelm et al. (1994) The Urokinase/Urokinase receptor system: A new target for cancer therapy? In: Schmitt M., Graeff H., Kindermann G. (Hrsg): Prospects in Diagnosis and Treatment of Cancer. International Congress Series, Excerpta Medica 1050, Amsterdam, Elsevier 10 1994, pp145-156). An Kulturen humaner Kolonkarzinomzellen wurde beobachtet, daß deren Fähigkeit, eine extrazelluläre Matrix zu durchwandern, vom Sättigungsgrad der uPA-Rezeptoren mit aktivem uPA 15 abhängig ist (Hollas et al., Cancer Res. 51 (1991), 3690-3695). Ebenfalls im Zellkulturmodell wurde eine Reduktion des invasiven Potentials von Zellen beobachtet, wenn die proteolytische Aktivität von uPA durch PAI-1 (Cajot et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87 (1990), 6939-6943) oder PAI-2 (Baker et al., Cancer Res. 50 (1990), 4676-4684) gehemmt wurde. Ein 20 vergleichbarer Effekt wurde bei Hemmung der Bindung von uPA an die Zelloberfläche durch Blockierung des Rezeptors mittels proteolytisch inaktiver uPA-Varianten erzielt (Cohen et al., Blood 78 (1991), 479-487; Kobayashi et al., Br. J. Cancer 67 (1993), 537-544). Auch die Transfektion epidermoider Karzinomzellen mit einem Plasmid, das ein Antisense- 25 Transkript gegen einen Teil von uPAR exprimiert, führte durch Unterdrückung der uPAR-Synthese zur Verringerung der Invasivität dieser Zellen (Kook, EMBO J. 13 (1994), 3983-3991). Gegen uPA und PAI-1 gerichtete Antikörper reduzierten das invasive Potential von Lungenkrebszellen in vitro (Liu et al., Int. J. Cancer 60 (1995), 501-506).

30

Der Einfluß des Plasminogenaktivator-Systems auf den Metastasierungsprozeß konnte auch in Tumor-Tiermodellen belegt werden. So wurden die

- 3 -

durch menschliche Karzinomzellen verursachte Bildung von Lungenmetastasen in Hühnerembryos durch Zugabe von Antikörpern gegen uPA fast vollständig verhindert (Ossowski und Reich, Cell 35 (1983), 611-619). Metastasierende menschliche Karzinomzellen wurden mit einem Expressionsplasmid transfiziert, das für eine proteolytisch inaktive, aber uPAR-bindende uPA-Mutante kodierte. Im Mausmodell zeigte sich, daß die Karzinomzellen, die inaktives uPA synthetisierten, nach Injektion im Vergleich zu den nichttransfizierten Zellen eine signifikant geringere Anzahl an Metastasen bildeten (Crowley et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90 (1993), 5021-5025). Nach Verabreichung von uPA-Antisense Oligonukleotiden wurde darüber hinaus eine Inhibierung der intraperitonealen Ausbreitung von humangen Ovarialkarzinomzellen in Nacktmäusen beobachtet (Wilhelm et al., Clin. Exp. Metast. 13 (1995), 296-302).

In den letzten Jahren wurde die klinische Relevanz von Faktoren des Plasminogenaktivator-Systems (uPA, uPAR, PAI-1 und PAI-2) für die Prognose von Patienten mit soliden malignen Tumoren intensiv untersucht. Dabei erwies sich der uPA-Antigengehalt bei verschiedenen Tumoren (z.B. Brust, Eierstock, Magen, Lunge, Niere etc.) sowohl für das rezidivfreie Überleben als auch für das Versterben als ein starker Prognosefaktor (siehe beispielsweise Schmitt et al., J. Obstet. Gynaecol. 21 (1995), 151-165; Jaenicke et al., Breast Cancer Res. Treat. 24 (1993), 195-208; Kuhn et al., Gynecol. Oncol. 55 (1994), 401-409; Nekarda et al., Lancet 343 (1994), 117; Pedersen et al., Cancer Res. 54 (1994), 4671-4675). Ebenso korrelieren erhöhte Konzentrationen an uPAR in Lungen- (Pedersen et al., *supra*) und Brustkrebsgewebe (Duggan et al., Int. J. Cancer 61 (1995), 597-600; Ronne et al., Breast Cancer Res. Treat. 33 (1995), 199-207) sowie bei Magenkrebs sowohl im Tumorgewebe selbst (Heiss et al., J. Clin. Oncol. 13 (1995), 2084-2093) als auch bei den ins Knochenmark ausgestreuten Tumorzellen (Heiss et al., Nature Medicine 1 (1995), 1035-1039) mit einer schlechten Prognose.

- 4 -

Der Einsatz von synthetischen uPA-Inhibitoren bietet die Möglichkeit, die Invasion und Ausbreitung von Tumorzellen zu unterdrücken. Allerdings ist die Entwicklung spezifischer uPA-Inhibitoren mit Schwierigkeiten behaftet, da der Plasminogenaktivator von Gewebetyp (tPA) eine identische Spezifität 5 für die Spaltung der Peptidbindung Arg560/Val561 von Plasminogen aufweist. In den meisten Fällen hemmen daher niedermolekulare uPA-Inhibitoren auch tPA und damit auch tPA-vermittelte Fibrinolyse. Außerdem muß gewährleistet sein, daß synthetische uPA Inhibitoren keine starke Hemmung von Plasmin zeigen.

10

Trotz dieser Einschränkungen sind einige Hemmstoffe bekannt, die eine gewisse Spezifität gegenüber uPA, jedoch geringe inhibitorische Kapazität besitzen, wie etwa Benzamidin- und  $\beta$ -Naphthamidin-Derivate, wobei die wirksamste Verbindung uPA mit  $K_i = 2,2 \mu\text{mol/l}$  hemmt (Stürzebecher und 15 Markwardt, Pharmazie 33 (1978), 599), oder Amilorid mit einem  $K_i = 7 \mu\text{mol/l}$  (Vassalli und Belin, FEBS. Lett. 214 (1987), 187-191).

DE-A-30 35 086 offenbart Cyclohexancarbonsäurederivate, die inhibitorische Wirkungen auf Proteasen wie Trypsin, Chymotrypsin, Thrombin oder 20 uPA haben. Die untersuchten Verbindungen zeigen jedoch nur eine recht geringe und darüber hinaus unspezifische uPA-Inhibierung. EP-A-0 183 271 offenbart Lysinderivate und deren Verwendung als Proteaseinhibitoren. Es wird auch ein Benzamidino-Lysinderivat (Verbindung 108) beschrieben, das in vitro eine uPA-Hemmung, jedoch auch eine vergleichbare Wirkung auf 25 andere Proteasen wie Trypsin oder Plasma-Kallikrein aufweist. WO 95/17885 offenbart niedermolekulare Polypeptide als uPA-Inhibitoren.

Eine weitere Klasse von bekannten uPA-Inhibitoren stellen 4-substituierte Benzothiophen-2-carboxamidine mit einem  $K_i = 0,16 \mu\text{mol/l}$  im Falle von 30 Benzothiophen-623 dar (Towle et al., Cancer Res. 53 (1993), 2553-2559). Diese Hemmstoffe haben eine signifikant höhere Affinität für uPA im Vergleich zu tPA und Plasmin. Auch uPAR-gebundenes uPA wird mit hoher

- 5 -

Effizienz gehemmt. Ein Nachteil dieser Substanzen liegt allerdings darin, daß die chemische Synthese kompliziert ist und kaum Möglichkeiten für die Modifizierung der Struktur vorhanden sind, bzw. bisher gezeigt werden konnte.

5 Die Entwicklung weiterer Hemmstoffe von uPA ist daher für die weitere Aufklärung der Rolle von uPA und uPAR bei verschiedenen Krankheiten, speziell bei der Tumorausbreitung und Metastasierung, von großem Nutzen.

10  $\text{Na-}$ -Arylsulfonyl- und  $\text{Na-}$ Arylsulfonyl-amino-acyl-Derivate des 3-Amidinophenylalanins sind als selektive Hemmstoffe von Thrombin (Markwardt et al., Thromb. Res. 17 (1980), 425-431) bzw. von Gerinnungsfaktor Xa (Stürzebecher et al., Thromb. Res. 54 (1989), 245-252) bekannt. Auch in WO 92/08709, WO 94/18185 und WO 96/05189 wird die Verwendung von Amidinophenylalaninderivaten als Hemmstoffe für die Blutgerinnung, 15 insbesondere als Hemmstoffe für Thrombin, offenbart.

20 Intensiv wurden Piperidide und Piperazide des 3-Amidinophenylalanins untersucht, unter denen auch Leitstrukturen zur Hemmung fibrinolytischer Enzyme gefunden wurden (Stürzebecher et al., J. Enzyme Inhibition 9, 87-99, 1995; Stürzebecher et al., J. Med. Chem. 40, 3091-3099, 1997). Während bei Stürzebecher et al. (1995) nur eine Hemmung von Thrombin, Faktor Xa, Plasmin und Trypsin beschrieben ist, finden sich bei Stürzebecher et al. (1997) auch Angaben zur Hemmung von uPA. Bei  $\text{Na-2-}$ Naphthylsulfonyl-,  $\text{Na-2-(2,2,5,7,8-Pentamethylchroman-6-yl)sulfonyl-}$  und 25  $\text{Na-2-Campher-10-yl-sulfonyl-}$ substituierten 3-Amidinophenylalaninpiperaziden wird für uPA ein  $K_i$ -Wert von 28 bis 140  $\mu\text{mol/l}$  gefunden, der um drei Größenordnungen höher als die Inhibitionskonstante für Thrombin ist. Somit konnte nicht davon ausgegangen werden, daß 3-Amidinophenylalaninderivate als Urokinaseinhibitoren geeignet sind.

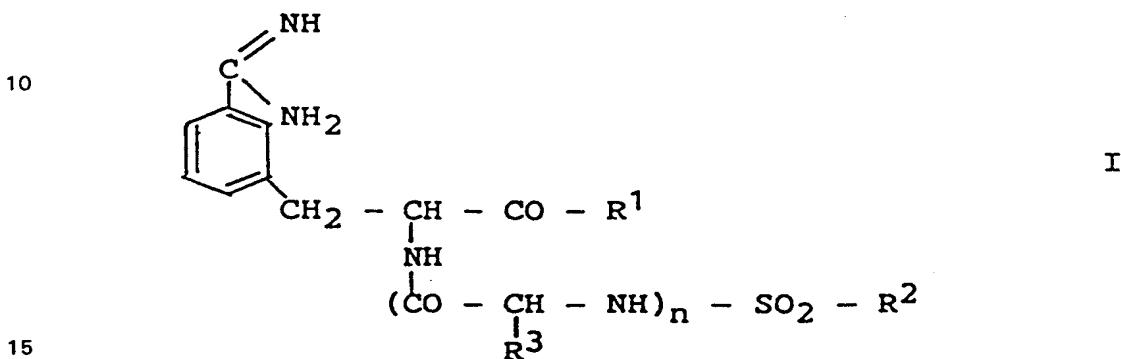
30

Überraschenderweise wurde jedoch gefunden, daß an Position 2 mit einem Phenylrest substituierte 3-Amidinophenylalaninderivate selektive und in vivo

- 6 -

wirksame Hemmstoffe von uPA darstellen. Weiterhin wurde gefunden, daß diese Substanzen eine hohe Selektivität für Lymphgewebe aufweisen und sich daher als Mittel zum Targeting von Lymphzellen, beispielsweise zur Behandlung von malignen Erkrankungen des Lymphgewebes wie etwa 5 Lymphomen eignen.

Die vorliegende Erfindung betrifft von 3-Amidinphenylalanin abgeleitete neue Urokinase-Inhibitoren der allgemeinen Formel I,



die als Racemate sowie als L- bzw. D-konfigurierte Verbindungen vorliegen und in denen

R1 (a) OH oder OR<sup>4</sup> ist, wobei R<sup>4</sup> ein gegebenenfalls z.B. mit Hydroxyl, Carboxyl, Sulfonyl, Nitro, Cyano, Oxo oder/und Halogen substituiertes, verzweigtes oder unverzweigtes C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>-Alkyl, C<sub>3</sub>-C<sub>8</sub>-Cycloalkyl oder Aralkyl, z.B. Benzyl oder Phenylethyl ist,

20 (b) eine Gruppe der Formel  $\begin{array}{c} R^5 \\ \diagup \\ -N \\ \diagdown \\ R^6 \end{array}$  darstellt, in welcher R<sup>5</sup> und R<sup>6</sup>

25 R<sup>6</sup> beliebige mit der Gesamtstruktur kompatible Reste sind, wobei insbesondere

(i) R<sup>5</sup> und R<sup>6</sup> H sind,

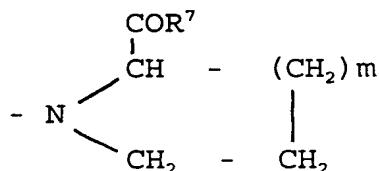
30 (ii) R<sup>5</sup> H ist und R<sup>6</sup> ein gegebenenfalls z.B. mit Hydroxyl, Carboxyl, Sulfonyl, Nitro, Cyano, Oxo oder/und Halogen substituiertes verzweigtes oder unverzweigtes C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>-

- 7 -

Alkyl, Aralkyl, z.B. Benzyl oder Phenylethyl, oder C<sub>5</sub>-C<sub>8</sub>  
Cycloalkyl ist,

- (iii) R<sup>5</sup> und R<sup>6</sup> jeweils unabhängig ein gegebenenfalls z.B. mit Hydroxyl oder/und Halogen substituiertes, unverzweigtes oder verzweigtes C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub> Alkyl sind oder
- (iv) R<sup>5</sup> H ist und R<sup>6</sup> -NH<sub>2</sub> oder eine insbesondere mit Aryl oder Heteroaryl substituierte Aminogruppe ist,
- (v) R<sup>5</sup> H oder ein gegebenenfalls z.B. mit Hydroxyl oder/und Halogen substituiertes, unverzweigtes oder verzweigtes C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub> Alkyl ist und R<sup>6</sup> der Rest einer Aminosäure, z.B. einer  $\alpha$ -,  $\beta$ - oder  $\omega$ -Aminocarbon- oder Aminosulfonsäure, oder der Rest eines Peptids z.B. mit einer Länge bis zu 50 Aminosäuren oder eines Polypeptids z.B. mit einer Länge von mehr als 50 Aminosäuren bis 1000 Aminosäuren ist,

(c) eine Gruppe der Formel

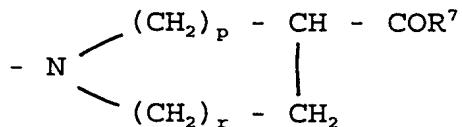


darstellt, in welcher m die Zahl 1 oder 2 bezeichnet, und in welcher eine oder mehrere der Methylengruppen gegebenenfalls z.B. mit einem Hydroxyl-, Carboxyl-, C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>-Alkyl- oder Aralkylrest, z.B. Benzyl oder Phenylethyl, substituiert sind, wobei die Gruppe (c) racemisch oder D- bzw. L-konfiguriert ist, und R<sup>7</sup> die Bedeutung von R<sup>1</sup> in den Ziffern (a), (b) und (f) aufweist.

30

- 8 -

(d) eine Gruppe der Formel



5

darstellt, in welcher  $p = r = 1$ ,  $p = 1$  und  $r = 2$  oder  $p = 2$  und  $r = 1$  sind und in welcher eine oder mehrere der Methylengruppen gegebenenfalls z.B. mit einem Hydroxyl-, Carboxyl-,  $C_1$ - $C_4$ -Alkyl- oder Aralkylrest, z.B. Benzyl oder Phenylethyl, substituiert sind, und  $R^7$  die Bedeutung von  $R^1$  in Ziffer (a), (b) und (f) aufweist,

10

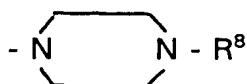
15

20

(e) eine Piperidylgruppe darstellt, die gegebenenfalls in einer der Stellungen 2, 3 und 4 z.B. mit einem C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>-Alkyl-, C<sub>1</sub>-C<sub>3</sub>-Alkoxy- oder Hydroxylrest substituiert ist, wobei gegebenenfalls an die heterocycloaliphatischen Ringe der Formeln (c), (d), (e) ein weiterer aromatischer oder cycloaliphatischer Ring, vorzugsweise Phenyl oder Cyclohexyl, in 2,3 oder 3,4 Stellung, bezogen auf das Heteroatom, an kondensiert ist,

(f) eine Gruppe der Formel

25



darstellt, in welcher  $R^8$

30

- (i) einen gegebenenfalls z.B. mit  $C_1$ - $C_6$ -Alkyl,  $C_1$ - $C_3$ -Alkoxy, Hydroxyl, Carboxyl, Sulfonyl, Nitro, Cyano, Oxo oder/und Halogen substituierten  $C_1$ - $C_6$ -Alkyl- oder Arylrest, wie z.B. Phenyl, p-Halogenphenyl, Naphthyl,
- (ii) einen gesättigten oder ungesättigten, verzweigten oder unverzweigten  $C_1$ - $C_6$ -Alkoxyrest oder

- 9 -

(iii) einen gegebenenfalls z.B. mit C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>-Alkyl, C<sub>1</sub>-C<sub>3</sub>-Alkoxy, Hydroxyl, Carboxyl, Sulfonyl, Nitro, Cyano, Oxo oder/und Halogen substituierten Phenoxy- bzw. Benzyloxycarbonylrest bedeutet,

5

(g) einen Acylrest der Formel -COX darstellt, wobei X

(i) H, einen gegebenenfalls z.B. mit Hydroxyl, Carboxyl, Sulfonyl, Nitro, Cyano, Oxo oder/und Halogen substituierten, unverzweigten oder verzweigten Alkylrest, vorzugsweise einen C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>-Alkylrest, insbesondere Methyl,

10

(ii) einen gegebenenfalls z.B. mit C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>-Alkyl, C<sub>1</sub>-C<sub>3</sub>-Alkoxy, Hydroxyl, Carboxyl, Sulfonyl, Nitro, Cyano, Oxo oder/und Halogen substituierten Aryl- oder Heteroarylrest, wie z.B. Phenyl, p-Halogenphenyl, Thienyl oder

15

(iii) einen gegebenenfalls z.B. mit Hydroxyl, Carboxyl, Sulfonyl, Nitro, Cyano, Oxo oder/und Halogen substituierten Cycloalkylrest, vorzugsweise einen C<sub>3</sub>-C<sub>10</sub>-Cycloalkylrest bedeutet,

20

(h) einen Aralkylrest, z.B. Benzyl oder Phenylethyl, darstellt, in dem der aromatische Rest gegebenenfalls z.B. mit einem Halogenatom, einer C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>-Alkyl-, C<sub>1</sub>-C<sub>3</sub>-Alkoxy-, Hydroxy-, Cyano-, Carboxyl-, Sulfonyl- oder Nitrogruppe substituiert ist,

25

(i) einen Carbonsäureamidrest der Formel -CONR'R", einen Thiocarbonsäureamidrest -CSNR'R" oder einen Essigsäureamidrest -CH<sub>2</sub>-CONR'R" darstellt, wobei

30

(i) R' und R" H sind,

(ii) R' und R" jeweils unabhängig C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>-Alkyl sind,

(iii) R' H ist und R" C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>-Alkyl ist,

(iv) R' H ist und R" Aryl, z.B. Phenyl, ist oder

- 10 -

(v) R' und R" mit dem Stickstoffatom einen heterocycloaliphatischen Ring mit 5-7 Ringgliedern, der ein weitere Heteroatom z.B. N, O oder/und S tragen kann, bilden,

5 (j) einen SO<sub>2</sub>-Y-Rest darstellt, in dem Y

(i) ein gegebenenfalls z.B. mit Hydroxyl, Carboxyl, Sulfonyl, Nitro, Cyano, Oxo oder/und Halogen substituiertes C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>-Alkyl, vorzugsweise Methyl, Trifluormethyl, Trichlormethyl,

10 (ii) ein gegebenenfalls z.B. mit C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>-Alkyl, C<sub>1</sub>-C<sub>3</sub>-Alkoxy, Hydroxyl, Carboxyl, Sulfonyl, Nitro, Cyano, Oxo oder/und Halogen substituiertes Aryl oder Heteroaryl, wie z.B. Phenyl, 4-Methyl-phenyl, 2,4,6-Trimethyl-phenyl, 2,4,6-Triisopropyl-phenyl, 4-Methoxy-2,3,6-Trimethyl-phenyl, 2,2-Dimethyl-6-methoxy-chromanyl, 2,2,5,7,8-Pentamethyl-chromanyl, Anthrachinonyl, Naphthyl oder Chinolyl, bzw. O-Aryl, vorzugsweise O-Phenyl, oder O-Heteroaryl oder

15 (iii) -NR'R" ist, wobei R' und R" jeweils unabhängig H oder C<sub>1</sub>-C<sub>3</sub>-Alkyl bedeuten,

20 (k) einen cycloaliphatischen Ring mit 5 bis 8 C-Atomen darstellt, der ggf. z.B. mit einer C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>-Alkyl-, C<sub>1</sub>-C<sub>3</sub>-Alkoxy-, Halogen-, Hydroxyl- oder/und Oxogruppe substituiert ist,

25 (l) einen gegebenenfalls z.B. mit C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>-Alkyl, C<sub>1</sub>-C<sub>3</sub>-Alkoxy, Hydroxyl, Carboxyl, Sulfonyl, Nitro, Cyano, Oxo oder/und Halogen substituierten Heteroarylrest, wie z.B. Pyridyl oder Pyrimidyl, oder heterocycloaliphatischen Rest, beispielsweise N-Methylpiperidyl darstellt,

- 11 -

(m) einen funktionalisierten Alkylrest der Formel  $-(CH_2)_n-X$  darstellt, wobei die Alkylkette unverzweigt oder verzweigt ist,  $n = 1$  bis 8 bedeutet und der funktionelle Rest X

5 (i) eine Hydroxylgruppe darstellt, deren H-Atom gegebenenfalls durch eine  $C_1-C_4$ -Alkyl-, Aralkyl-, z.B. Benzyl oder Phenylethyl, Aryl-, z.B. Phenyl,  $C_1-C_4$ -Hydroxyalkyl- oder Acylgruppe CO-Alkyl,  $(C_1-C_6)$ , substituiert ist,

(ii) ein Halogenatom bedeutet,

10 (iii) eine tertiäre Aminogruppe der Formel  $-N(Alk)_2$  darstellt, wobei die Alkylgruppen 1 bis 3 C-Atome sowie vorzugsweise die gleiche Bedeutung besitzen und das Stickstoffatom gegebenenfalls einem heterocycloaliphatischen Ring mit 5-7 Ringgliedern, der ein weiteres Heteroatom, z.B. N, O oder/und S tragen kann, angehört,

15

$R^2$  einen gegebenenfalls z.B. mit  $C_1-C_6$ -Alkyl,  $C_1-C_3$ -Alkoxy, Hydroxyl, Carboxyl, Sulfonyl, Nitro, Cyano, Oxo oder/und Halogen substituierten Phenylrest, wie beispielsweise Phenyl, 4-Methyl-phenyl, 2,4,6-Trimethyl-phenyl, 2,4,6-Triisopropyl-phenyl, 4-Methoxy-2,3,6-trimethyl-phenyl darstellt,

20

$R^3$  H oder verzweigtes bzw. unverzweigtes  $C_1-C_4$ -Alkyl ist und n 0 oder 1 bedeutet.

25

Die Verbindungen können auch als Salze vorzugsweise als physiologisch verträgliche Säuresalze, z.B. als Salze von Mineralsäuren, besonders bevorzugt als Hydrochloride, oder als Salze von geeigneten organischen Säuren vorliegen.

30

Von den in den allgemeinen Ansprüchen definierten Verbindungen sind solche, bei denen  $R^1$  einer Gruppe der Formeln (b), (d) und (f) entspricht,  $R^2$

- 12 -

einen einfach, zweifach oder dreifach alkylsubstituierten Phenylrest, insbesondere einen 2,4,6-substituierten Phenylrest, z.B. einen 2,4,6-Triisopropylphenyl-Rest darstellt und n = 0 ist, von besonderer Bedeutung.

5 Die Verbindungen der allgemeinen Formel I können in prinzipiell bekannter Weise, wie z.B. in WO 92/08709 und WO 94/18185 beschrieben, hergestellt und auf ihre biologische in vitro Aktivität gesetzt werden.

(L)-, (D)- oder (D,L)-3-Cyanphenylalanin-methylester-hydrochlorid wird mit 10 einem entsprechenden Sulfochlorid oder einer sulfonylierten Aminosäure bzw. deren Halogenid in Gegenwart einer Base zu einer Verbindung der allgemeinen Formel I mit Cyanfunktion, in der R<sup>1</sup> = OCH<sub>3</sub> ist und R<sup>2</sup> sowie R<sup>3</sup> und n den in den allgemeinen Ansprüchen definierten Bedeutungen 15 entspricht, umgesetzt. Durch milde saure oder alkalische Hydrolyse sind daraus die Verbindungen der allgemeinen Formel I mit Carbonsäurestruktur (R<sup>1</sup> = -OH) erhältlich, deren Veresterung mit einem entsprechenden Alkohol unter säurekatalytischen Bedingungen zu Verbindungen der allgemeinen Formel I führt, wobei R<sup>1</sup> = (a) bedeutet. Nach einem in der Peptidchemie 20 üblichen Verfahren, z.B. DCC-Verfahren in Gegenwart von HOBr, sind durch Umsetzung der Carbonsäuren der allgemeinen Formel I (R<sup>1</sup> = -OH) mit einem Nukleophil der Strukturen (b), (e) und (f) die Verbindungen mit 25 entsprechendem R<sup>1</sup> der allgemeinen Formel I vorstellbar. Für die Synthese von Verbindungen mit R<sup>1</sup> = (c) und (d) werden zunächst die Carbonsäuren der allgemeinen Formel I mit R<sup>1</sup> = OH mit cycloaliphatischen Aminosäureestern der Strukturen (c) und (d), wobei R<sup>7</sup> vorzugsweise -OCH<sub>3</sub> bzw. -OC<sub>2</sub>H<sub>5</sub> bedeutet, umgesetzt, die erhaltenen Carbonsäureester unter milden sauren oder alkalischen Bedingungen zu den entsprechenden Carbonsäuren hydrolysiert, die nachfolgend in bereits beschriebener Weise verestert oder 30 mit Nukleophilen der Struktur (b), (e) und (f) umgesetzt werden können, wobei Verbindungen der allgemeinen Formel I mit R<sup>1</sup> = (c) sowie (d) und R<sup>7</sup> = (a), (b), (e) und (f) erhalten werden.

- 13 -

Die Zielverbindungen der allgemeinen Formel I mit Amidinstruktur sind aus den Cyanverbindungen in bekannter Weise erhältlich, wobei in der Regel durch Addition von  $H_2S$  an die Cyangruppe zunächst die Thioamide erhalten werden, die durch S-Methylierung mit Methyliodid in die Thioimidoester und anschließend durch Behandlung mit Ammoniumacetat in alkoholischer Lösung in die Amidinoverbindungen überführt werden. Außerdem können gegebenenfalls aus den Cyanverbindungen mit Methanol oder Ethanol in Gegenwart von HCl-Gas und in bestimmten Fällen eines inerten Lösungsmittels die entsprechenden Imidoesterhydrochloride dargestellt werden, deren Umsetzung in alkoholischer Ammoniaklösung zu den Amidinoverbindungen führt.

Die erfindungsgemäßen Urokinaseinhibitoren können gegebenenfalls zusammen mit mindestens einem geeigneten pharmazeutischen Hilfs- oder Trägerstoff zur Herstellung von oral, subkutan oder intravenös verabreichtbaren Arzneimitteln zur Tumorbekämpfung oder in der Diagnostik verwendet werden. Ebenfalls möglich ist die Verabreichung in Kombination mit anderen Wirkstoffen, z.B. anderen Urokinaseinhibitoren wie etwa Antikörpern oder/und Peptiden.

Die Arzneimittel zur Tumorbekämpfung bei Menschen und Tieren können topisch, oral, rektal oder parenteral, z.B. subkutan oder intravenös, in Form von Tabletten, Dragees, Kapseln, Pellets, Suppositorien, Lösungen oder transdermalen Systemen, wie Pflastern, verabreicht werden.

Besonders bevorzugt handelt es sich bei der Verbindung der Formel (I) um  $Na$ -(2,4,6-Triisopropyl-phenylsulfonyl)-3-amidino-(D,L)-phenylalanin-4-ethoxycarbonyl-piperazid-hydrochlorid bzw. um das L-Entantiomere davon oder um ein pharmazeutisch verträgliches Salz dieser Verbindungen. Diese Substanzen haben ein gutes Löslichkeitsverhalten. In Trispuffer (pH 7,3) sind sie bis zu einer Konzentration von  $5 \times 10^{-5}$  mol/l löslich. Durch Zusatz

- 14 -

von 5% Ethanol steigt die Löslichkeit auf  $2 \times 10^{-4}$  mol/l und bei Zusatz von 5% DMSO auf  $10^{-3}$  mol/l.

Die erfindungsgemäßen Verbindungen sind in der Lage, hocheffizient das  
5 Wachstum oder/und die Ausbreitung von malignen Tumoren zu hemmen, z.B. die Tumorausbreitung beim Pankreaskarzinom, das Tumorwachstum des Mammakarzinoms sowie die Metastasierung von Tumoren. Dabei können die uPA-Inhibitoren gegebenenfalls zusammen mit anderen  
10 Antitumormitteln oder mit anderen Behandlungsarten, z.B. Bestrahlung oder chirurgischen Eingriffen, eingesetzt werden. Weiterhin sind die erfindungsgemäßen Inhibitoren auch für andere uPA-assoziierte Erkrankungen wirksam (z.B. bei der Verhinderung der Blasenbildung bei der Hauterkrankung Pemphigus vulgaris).

15 Erfindungsgemäße uPA Inhibitoren sind vorzugsweise dadurch gekennzeichnet, daß sie einen mindestens zweifach, vorzugsweise mindestens 5-fach und besonders bevorzugt mindestens 10-fach geringeren  $K_i$ -Wert für uPA gegenüber tPA aufweisen. Weiterhin ist bemerkenswert, daß die erfindungsgemäßen Verbindungen die Blutgerinnung nur geringfügig  
20 beeinflussen, da sie für eine effektive Hemmung von Thrombin und Faktor Xa zu hohe  $K_i$ -Werte haben.

Die erfindungsgemäßen Substanzen der Formel I können in Form von Konjugaten mit physiologisch wirksamen Substanzen eingesetzt werden, z.B. mit Radiomarkierungen oder mit zytotoxischen Mitteln, z.B. Chemo-therapeutika wie cis-Platin oder 5-Fluor-Uracil, oder Peptiden. Weiterhin können die Substanzen auch in die Membran von Trägervesikeln, z.B. Liposomen, eingebaut werden und somit ein Targeting von in den Trägervesikeln eingeschlossenen Wirksubstanzen, z.B. zytotoxischen Mitteln wie etwa Doxorubicin ermöglichen.

- 15 -

Eine weitere Indikation für die Substanzen der allgemeinen Formel II:

X-R<sup>2</sup>

5       worin X einen beliebigen Rest, insbesondere einen organischen Rest darstellt, z.B. einen Rest wie für Verbindungen der Formel I definiert, aber auch einen anderen Rest, z.B. eine physiologisch wirksame Substanz wie etwa ein zytotoxisches Mittel, ein Peptid oder eine Radiomarkierung, ein Lipid oder ein Kohlenhydrat bedeutet, und R<sup>2</sup> eine Gruppe wie zuvor definiert bedeutet, insbesondere einen 2,4,6-dreifach substituierten 10      Phenylrest, z.B. 2,4,6-Triisopropylphenyl, ist das Targeting von Lymphzellen, welches aufgrund ihrer um den Faktor 10 bis 20 höheren Affinität für Lymphknotengewebe gegenüber anderen Gewebetypen möglich wird. Vorzugsweise ist R<sup>2</sup> über eine Sulfonylgruppe -SO<sub>2</sub>- mit dem Rest X 15      verbunden. Somit eignen sich diese Substanzen hervorragend als Mittel zur Diagnostik oder zur Behandlung von Erkrankungen des Lymphgewebes, insbesondere malignen Erkrankungen wie etwa Tumormetastasen und Lymphomen. Die Verabreichung der Substanzen kann wie zuvor bereits beschrieben erfolgen. Eine Behandlung von Erkrankungen des Lymphgewe- 20      bes erfolgt vorzugsweise durch eine mehrtägige Verabreichung des Medikaments, z.B. über einen Zeitraum von 5 bis 20 Tagen, mit einer anschließenden Behandlungspause und gegebenenfalls ein oder mehr- maligem Wiederholen der Applikation.

25      Die Erfindung soll an den folgenden Beispielen und Abbildungen näher erläutert werden. Es zeigen:

Figur 1      das Ergebnis einer Zytotoxizitätsbestimmung einer erfindungsgemäßen Substanz,

30      Figur 2      das Ergebnis eines Versuchs zur Inhibierung des Abbaus einer Fibrinmatrix durch humane Mammakarzinomzellen,

- 16 -

Figuren 3

und 4 die Wirkung einer erfindungsgemäßen Substanz auf die Ausbreitung, das Wachstum und die Metastasierung von Mammakarzinomzellen in der Ratte,

5

Figur 5 die Wirkung einer erfindungsgemäßen Substanz auf das Wachstums eines Pankreastumors in der Ratte und

Figur 6 die Wirkung einer erfindungsgemäßen Substanz auf das Wachstum humaner Mammakarzinomzellen in Mäusen.

10  
15  
Beispiele

1.  **$\text{Na-2,4,6-Triisopropylphenylsulfonyl-(L)-3-amidino-phenylalanin-4-ethoxycarbonyl-piperazid-hydrochlorid}$**

1.1  **$\text{Na-2,4,6-Triisopropylphenylsulfonyl-(L)-3-cyan-phenylalanin-methylester}$**

20 5 g (L)-3-Cyanphenylalanin-methylester wurden in 100 ml Dioxan suspendiert, 4,45 ml N-Methylmorpholin (NMM) zugefügt und 30 min gerührt. Nach Zugabe von 5,97 g 2,4,6-Triisopropylbenzolsulfochlorid in fester Form wurde 3 Tage gerührt, danach ausgefallenes NMM-HCl abfiltriert, das Lösungsmittel abdestilliert und das erhaltene Rohprodukt über Kieselgel (KG) 60 (Chloroform) gereinigt. Ausbeute: 25 8,34 g Sirup (90%).

1.2  **$\text{Na-2,4,6-Triisopropylphenylsulfonyl-(L)-3-cyan-phenylalanin}$**

30 8,34 g der Verbindung 1.1 wurden in einer Mischung aus je 50 ml Essigsäure und 1 N Salzsäure 8 Std. unter Rückfluß erhitzt, nach dem Erkalten 2x mit Ethylacetat extrahiert, die vereinigten Ethylacetatlö-

- 17 -

sungen über  $MgSO_4$  getrocknet und das Lösungsmittel abdestilliert. Nach Reinigung über KG 60 (Chloroform) wurden 5,8 g eines festen Produktes erhalten (72%).

5      **1.3  $\text{Na-2,4,6-Triisopropylphenylsulfonyl-(L)-3-cyan-phenylalanin-4-ethoxycarbonyl-piperazid}$**

10     5,7 g der Verbindung 1.2 wurden in 100 ml Tetrahydrofuran (THF) gelöst, auf 0°C abgekühlt, 2,22 g  $\alpha$ -Hydroxybenzotriazol (HOBr), 2,82 g Dicyclohexylcarbodiimid (DCC) zugefügt und 30 min gerührt. Nach Zugabe von 3,94 g 1-Ethoxycarbonyl-piperazin in 30 ml THF wurde über Nacht gerührt, danach ausgefallenes Dicyclohexylurea (DCU) abfiltriert, das Lösungsmittel abdestilliert und das erhaltene Rohprodukt über KG 60 (Chloroform) gereinigt. Ausbeute: 7,1 g eines amorphen Pulvers (96%).

15     **1.4  $\text{Na-2,4,6-Triisopropylphenylsulfonyl-(L)-3-amidino-phenylalanin-4-ethoxycarbonyl-piperazid Hydrochlorid}$**

20     7,1 g der Verbindung 1.3 wurden in 30 ml Pyridin gelöst, 30 Tropfen Triethanolamin (TEA) zugefügt, 10 min ein kräftiger Schwefelwasserstoffstrom eingeleitet und 2 Tage bei Raumtemperatur stehengelassen. Anschließend wurde das Lösungsmittel abdestilliert, der Rückstand in Ethylacetat gelöst, die organische Phase mit 1 N Salzsäure und gesättigter Kochsalzlösung gewaschen, über  $MgSO_4$  getrocknet und das Lösungsmittel abdestilliert. 7,2 g des auf diese Weise erhaltenen Thioamids wurden in 250 ml Aceton gelöst, die Lösung mit 17 g Methyliodid versetzt und 2 Tage bei Raumtemperatur unter Lichtschutz stehengelassen. Danach wurde das Lösungsmittel abdestilliert, das Thioimidester-hydroiodid (8,5 g) in 50 ml Methanol gelöst, 1,9 g Ammoniumacetat zugefügt und der Ansatz 4 Std. bei 60°C erwärmt. Das nach Abdestillieren des Lösungsmittels

- 18 -

erhaltene Rohprodukt wurde über Sephadex LH20 (Methanol) gereinigt. Das auf diese Weise erhaltene Amidin-hydroiodid wurde über Ionenaustauscher (Amberlite IRA-420) in das Hydrochlorid übergeführt. Ausbeute: 5,3 g eines amorphen Pulvers (69%).

5

**2.  $\text{Na-2,4,6-Triisopropylphenylsulfonyl-(D,L)-3-amidinopenyl-alanyl-nipecotinsäure-benzylamid Hydrochlorid}$**

**2.1  $\text{Na-2,4,6-Triisopropylphenylsulfonyl-(D,L)-3-cyan-phenylalanyl-nipecotinsäure-ethylester}$**

10

15

20

4,56 g  $\text{Na-2,4,6-Triisopropylphenylsulfonyl-(D,L)-3-cyan-phenylalanin}$  (aus (D,L)-3-Cyanphenylalanin-methylester-hydrochlorid und dem entsprechenden Sulfochlorid analog 1.1 und 1.2 dargestellt), 1,5 g HOBt und 2,42 g DCC wurden in 50 ml DMF gelöst, 1 Std. gerührt und danach 2,36 g Nipecotinsäure-ethylester zugefügt. Nach Rühren über Nacht wurde ausgefallenes DCU abfiltriert, das Lösungsmittel abdestilliert, der Rückstand in wenig Methanol gelöst und zur Kristallisation stehengelassen. Der gebildete Niederschlag wurde abgesaugt, mit Methanol gewaschen und getrocknet. Ausbeute: 4,46 g (75%).

25

30

**2.2  $\text{Na-2,4,6-Triisopropylphenylsulfonyl-(D,L)-3-cyan-phenylalanyl-nipecotinsäure}$**

4,4 g des vorher beschriebenen Ethylesters wurden in einer Mischung aus 35 ml Essigsäure und 25 ml 1 N HCl 2 Std. unter Rückfluß erhitzt. Nach Zugabe von 10 ml Wasser wurde zum Erkalten stehengelassen, wobei sich ein wachsartiges Produkt abschied. Nach Abgießen des Lösungsmittels wurden 200 ml Wasser zugesetzt, längere Zeit kräftig gerührt und die erhaltene feste Substanz

- 19 -

abgesaugt, mit Wasser gewaschen und getrocknet. Ausbeute: 3,84 g (92%).

2.3  **$\text{Na-2,4,6-Triisopropylphenylsulfonyl-(D,L)-3-cyan-phenylalanyl-nipecotinsäure-benzylamid}$**

10

2,28 g der vorher beschriebenen Verbindung 0,6 g HOBr und 0,97 g DCC wurden in 20 ml DMF gelöst, 1 Std. gerührt, anschließend 0,6 g Benzylamin zugefügt und weiter über Nacht gerührt. Nach Abfiltrieren des ausgefallenen DCU wurde das Lösungsmittel abdestilliert, der Rückstand in Methanol gelöst und die Lösung in 5-proz. Natriumhydrogencarbonatlösung/Eis gegossen. Nach 1 Std. wurde der gebildete Niederschlag abgesaugt, mit Wasser gewaschen und im Vakuum getrocknet. Ausbeute: 2,48 g (94%).

15

2.4  **$\text{Na-2,4,6-Triisopropylphenylsulfonyl-(D,L)-3-amidino-phenylalanyl-nipecotinsäure-benzylamid Hydrochlorid}$**

20

25

30

2,4 g der Verbindung 2.3 wurden in 30 ml Pyridin gelöst, 30 Tropfen TEA zugefügt, in die Lösung 10 min Schwefelwasserstoff eingeleitet und der Ansatz 2 Tage bei Raumtemperatur stehengelassen. Anschließend wurde das Lösungsmittel abdestilliert, der Rückstand in Ethylacetat aufgenommen und mit 1 N HCl ausgeschüttelt. Nach Waschen der organischen Phase mit gesättigter Kochsalzlösung und Trocknen über Natriumsulfat wurde das Lösungsmittel abdestilliert. 2,38 g des auf diese Weise erhaltenen Thioamids wurden in 100 ml Aceton gelöst, die Lösung mit 6,5 g Methyljodid versetzt und 20 Std. bei Raumtemperatur unter Lichtschutz stehengelassen. Danach wurde das Lösungsmittel abdestilliert, das Thioimidester-hydrojodid in 50 ml Methanol gelöst, 0,5 g Ammoniumacetat zugegeben und der Ansatz 4 Std. bei 60°C im Wasserbad erwärmt. Das nach Abdestillieren des Lösungsmittels erhaltene Rohprodukt konnte über KG

- 20 -

60 gereinigt werden. Die Elution erfolgte zunächst mit Chloroform, danach mit Chloroform/Methanol 9:1. Das so gereinigte Amidinhydroiodid wurde über Ionenaustauscher (Amberlite IRA-420) in das Hydrochlorid übergeführt. Ausbeute: 1,45 g eines amorphen Pulvers (56%).

Die Charakterisierung der Verbindungen erfolgte massenspektrometrisch, eine Reinheitsprüfung erfolgte mittels DC und HPLC.

10 3. **In vitro Hemmung von Urokinase durch ausgewählte Verbindungen der Formel I**

Konfiguration	R <sup>1</sup>	R <sup>2</sup>	n	K <sub>i</sub> , $\mu\text{mol/l}$
15 L	-N N-COOC <sub>2</sub> H <sub>5</sub>	TIPP	0	0,41
D,L	-N N-COOC <sub>2</sub> H <sub>5</sub>	TIPP	0	0,96

Abkürzungen: TIPP - 2,4,6-Triisopropylphenyl

20

Bestimmung der Hemmwirkung

Zur Bestimmung der Inhibitoraktivität wurden 200  $\mu\text{l}$  Tris-Puffer (0,05 mol/l, den Inhibitor enthaltend, 0,154 mol/l NaCl, 5% Ethanol pH 8,0), 25  $\mu\text{l}$  Substrat (Pefachrome UK oder Bz- $\beta$ Ala-Gly-Arg-pNA in H<sub>2</sub>O; Pentapharm

25 Ltd., Basel, Schweiz) und 50  $\mu\text{l}$  sc-Urokinase (Ribosepharm GmbH, Haan, Deutschland) bei 25°C inkubiert. Nach 3 min wurde die Reaktion durch Zugabe von 25  $\mu\text{l}$  Essigsäure (50%) unterbrochen und die Absorption bei 405 nm mittels Microplate Reader (MR 5000, Dynatech, Denkendorf, Deutschland) bestimmt. Die K<sub>i</sub>-Werte wurden nach Dixon durch lineare

- 21 -

Regression mittels eines Computerprogramms ermittelt. Die  $K_i$ -Werte sind das Mittel aus mindestens 3 Bestimmungen, die Standardabweichung lag unter 25%.

5      4. **In vitro Hemmung verschiedener Serinproteasen vom Trypsin-Typ durch ( $\text{Na}-(2,4,6\text{-Triisopropyl-phenylsulfonyl})-(\text{L})$ -3-amidino-phenylalanin-4-ethoxycarbonyl-piperazid (uPA-Inhibitor) und  $\text{Na}-(2\text{-Naphthylsulfonyl})-3\text{-amidinophenylalanin-N}'\text{-methylpiperazid (Naphthylsulfonyl-Derivat) als Vergleich}$**

	Ki [ $\mu\text{mol/l}$ ]	
	uPA-Inh.	Naphthylsulfonyl-Der.
10	Urokinase	0,41
	Plasmin	0,39
	Sc-tPA	4,9
15	Thrombin	0,49
	Faktor Xa	1,7
	Faktor XIIa	13
	Plasma-Kallikrein	7,2
	Glandulär-Kallikrein	> 1000
20	Trypsin	0,037
	Tryptase	6,3
		1,3
		33

Die Bestimmung der Hemmwirkung für die verwendeten Enzyme erfolgte nach dem in Beispiel 3 beschriebenen Prinzip.

25      Aus den oben angegebenen Werten ist ersichtlich, daß der erfindungsgemäße Urokinasehemmstoff uPA-Inhibitor überraschenderweise einen um mehr als den Faktor 10 kleineren  $K_i$ -Wert für Urokinase als für Einzelketten tPA (Sc-tPA) aufweist. Somit eignen sich die erfindungsgemäßen Substanzen als selektive Urokinaseinhibitoren. Zum Vergleich ist die Inhibitor-

30

- 22 -

aktivität des Naphthylsulfonyl-Derivats angeführt, das eine signifikant geringere *in vitro* Anti-uPA-Aktivität aufweist.

## 5. Bestimmung der Zytotoxizität

5

Für die Bestimmung der Zellproliferation/Zytotoxizität wurde ein kommerziell erhältlicher Test eingesetzt (Promega), welcher auf der zellulären Umsetzung eines Tetrazoliumsalzes beruht. Das aus dieser Reaktion resultierende farbige Produkt kann mittels eines ELISA-Spektrometers (ICN-Flow) 10 quantifiziert werden. Der synthetische Inhibitor (offene Kreise) hatte gegenüber dem Lösungsmittel (geschlossene Kreise) alleine keinen Einfluß auf das Zellwachstum humaner Ovarialkarzinomzellen OV-MZ-6 (Figur 1). Somit ist der erfindungsgemäße uPA-Inhibitor in pharmakologisch wirksamen Konzentrationen bis 40  $\mu$ M nicht zytotoxisch.

15

## 6. Inhibierung des Abbaus einer Fibrin-Matrix durch humane Mammakarzinomzellen

Zur Untersuchung der Fähigkeit von Tumorzellen eine extrazelluläre Matrix 20 abzubauen, wurde ein Fibrinmatrixabbau-Test entwickelt und verwendet. Je größer die proteolytische Aktivität der Tumorzellen, um so höher ist die Konzentration der Fibrinabbauprodukte im Matrixüberstand. Der Matrixabbaupazität entspricht der Konzentration der Fibrinabbauprodukte, welche mittels ELISA (D-Dimer) ermittelt werden.

25

Die Fibringele wurden in 24 Well Kulturplatten aus 200 ml Fibrinogen (50 mg/ml) in PBS (pH 7,4) durch 50  $\mu$ l Thrombin (10 U/ml) und 50  $\mu$ l CaCl<sub>2</sub> (150 mM) pro Well nach Inkubation für 30 min bei 37°C gebildet. 2 x 10<sup>5</sup> Mammakarzinomzellen wurden auf diese Fibrinmatrix in 1 ml DMEM 30 Kulturmedium, plus 10% fetalem Kälberserum und 2  $\mu$ g Glu-Plasminogen ausgesät und 4 h lang inkubiert. Danach wurde der Überstand zentrifugiert, um Zellen zu entfernen, und die Fibrinabbauprodukte mittels ELISA

- 23 -

quantifiziert. Die Zugabe des erfindungsgemäßen Inhibitors (A) in unterschiedlichen Konzentrationen führte zu einer signifikanten Inhibierung des Matrixabbaus durch Mammakarzinomzellen im Vergleich zu dem Naphthyl-Derivat (B), das keine Hemmung des Fibrinabbaus durch Mammakarzinomzellen zeigt (Figur 2).

**7. In vivo Test des uPA Inhibitors auf Tumorausbreitung, Tumorwachstum und Metastasierung in der Ratte**

10 **A) Brustkrebs-Modell**

10-25 mm<sup>3</sup> Rattenbrustkrebs-Tumorfragmente BN-472 wurden subkutan orthotropisch unter die Fettpolster der Brustdrüse in 6 bis 15 7 Wochen alten, weiblichen Brown Norwegian Ratten transplantiert (Tag 0). Die Behandlung der Tiere wurde 24 h nach der Tumorinokulation intraperitoneal begonnen. Jede Gruppe bestand aus 8 Tieren. Die Kontrollgruppe erhielt nur Injektionslösung (100 µl einer 10% Ethanol/Saline (0,9% NaCl) Lösung). Der Vergleichsgruppe des Naphthyl-Derivats (B) und der Therapiegruppe des erfindungsgemäßen uPA-Inhibitors (A) wurden in der oben genannten Lösung 20 eine Dosis von 1 mg/kg Körpergewicht täglich i.p. verabreicht. Die Behandlung wurde über einen Zeitraum von 4 Wochen durchgeführt.

25 Die Abmessungen der subkutanen Tumoren und die Gewichte der Tiere wurden wöchentlich bestimmt. Am Ende der Behandlung wurden die Tiere getötet und Tumorgewichte, Organgewichte und die Anzahl von Metastasen in relevanten Geweben bestimmt.

30 Die Behandlung mit uPA-Inhibitor (A) führte zu einer signifikanten Reduktion des Primärtumorgewichtes sowie der axillären Lymphknoten ( $p = 0,003$  bzw.  $p = 0,005$ ) im Vergleich mit dem Naphthyl-Derivat (B) und Kontrollgruppen ohne Inhibitor (Fig. 3 und 4). Die Gewichte

- 24 -

von Lunge, Leber, Niere und Milz bei den mit dem uPA-Inhibitor behandelten Tieren waren unverändert gegenüber den Kontrolltieren.

**B) Pankreaskarzinom-Modell**

5

Fragmente des transplantierbaren und metastasierenden Pankreas-adenokarzinoms CA20948 der Ratte wurden aus Donortieren explantiert. Nach Zellvereinzelung wurden gleiche Mengen an suspendierten Tumorzellen zusammen mit 2 mg Matrigel jedem der 10 Empfängertiere, männlichen 10 Wochen alten Lewisratten ( $n=9$ ), subkutan implantiert. Die Durchführung der Behandlung sowie Zusammensetzung der Therapiegruppen war identisch wie unter A).

15 Wie aus Figur 5 ersichtlich ist, findet man beim erfindungsgemäßen uPA-Inhibitor (offene Kreise) gegenüber dem Naphthyl-Derivat (geschlossene Kreise) und der Kontrollgruppe (Dreiecke) eine signifikante Verringerung des Tumorgewichts und eine Verminderung des Wachstums bei den entstehenden Ratten-Pankreaskarzinom.

20 **C) Wiederholung der Versuche mit geänderter Applikationsart**

25 Die in den Abschnitten A und B beschriebenen Versuche wurden mit geänderter Applikationsart des Inhibitors wiederholt. Dabei wurde ohne Veränderung der täglichen Dosis der Inhibitor im Mammakarzinom-Modell subkutan ( $n=9$ ) und im Pankreasadenokarzinom-Modell intraperitoneal ( $n=8$ ) appliziert. Die Ergebnisse dieser Wiederholungsversuche entsprachen in Tendenz und Umfang den bereits dargestellten Ergebnissen.

30

- 25 -

**D) Zusammenfassung der Ergebnisse**

In allen Versuchen wurde durch Behandlung mit dem Inhibitor eine erhebliche Reduktion der Tumorgröße bzw. des Tumorgewichts und der Anzahl bzw. der Masse von Tochtergeschwülsten im Vergleich zu den Kontrollgruppen erreicht. Im Mammatumor-Modell waren in der Inhibitor-behandelten Gruppe, die mittleren Tumorgewichte am Ende der Behandlung auf 23% (i.p.) bzw. 37% (auf s.c.) im Vergleich zu der mit Vehikel behandelten Kontrolle reduziert. Die Anzahl der Lungenfoci in Inhibitor-behandelten Gruppen waren auf 9% (i.p.) bzw. 32% (s.c.) und die mittleren Gewichte der axillären Lymphknoten auf 27% (i.p.) bzw. 48% (s.c.) reduziert.

Im Pankreastumor-Modell waren die Massen des tumorhaltigen Pankreas in den Inhibitor-behandelten Gruppen um 76% (i.p.) bzw. 34% (s.c.), die Massen der subkutanen Tumoren um 54% (i.p.) bzw. 60% (s.c.) verglichen mit den jeweiligen Vehikel-behandelten Gruppen reduziert. Die Anzahl detekter Leberfoci in Inhibitor-behandelten Gruppen war 29% (i.p.), bzw. 2% (s.c.) im Vergleich zu den Vehikel-behandelten Kontrollgruppen.

Die Entwicklung der Körpergewichtszunahme und der Vergleich der Organgewichte zwischen Inhibitor- und Vehikel-behandelten Gruppen ließen keine Hinweise für eine etwaige erhebliche Toxizität des Inhibitors unter den beschriebenen Bedingungen erkennen.

**8. Behandlung humaner Brustkrebszellen in der Nacktmaus**

Um die *in vivo* Effizienz des Inhibitors zur Hemmung des Tumorwachstums humaner Mammakarzinomzellen zu testen (MDA-BA-231), wurden  $6 \times 10^6$  Zellen subcutan in die rechte Flanke von Balb/c Nacktmäusen (4-6 Wochen alt) injiziert. Die Tumorzellen wurden vor Inokulation mit dem synthetischen

- 26 -

uPA-Inhibitor vorinkubiert. Nach 24 h wurden die Mäuse mit einer Dosis von 1,2 mg/kg Körpergewicht intraperitoneal wie unter A) beschrieben zweimal wöchentlich behandelt. Die Tumogröße wurde wöchentlich durch Messung der zwei größten Durchmesser bestimmt.

5

Wie aus Figur 6 ersichtlich ist, nimmt das Tumorvolumen bei der Verabreichung des uPA-Inhibitors (offene Kreise) signifikant langsamer zu als in der Kontrollgruppe (geschlossene Kreise) wo Ethanol in Saline verabreicht wurde.

10

### 9. Die Biodistribution des Inhibitors in der Ratte

Die Biodistribution des Inhibitors wurde in zwei unabhängigen Versuchen in Gewebeaufschlüssen von Ratten ermittelt, die 5 bzw. 10 Tage lang täglich 15 einmal mit 1 mg/kg Inhibitor i.p. behandelt worden waren. Zum Aufschluß wurden jeweils 100 mg Gewebe mechanisch zerkleinert und mit 200 µl 1% Triton X-100 in physiologischer Kochsalzlösung vermischt. Nach Zugabe von 400 µl Ethanol wurde der Aufschluß 1 min mit Ultraschall behandelt. Der Gewebeextrakt wurde 15 min bei 12.000 x g zentrifugiert. Zur 20 Vorreinigung wurde der Überstand auf eine mit 1 ml Methanol und 1 ml Wasser equilibrierte C18-Silica Reversed Phase Vorsäule (Sep-Pak® cartridge C18, 1 ml Waters, Eschborn, Deutschland) aufgetragen, hintereinander mit 2 x 1 ml H<sub>2</sub>O, 1 ml 10% Methanol, 1 ml H<sub>2</sub>O, 1 ml 5% Acetonitril, 0,04% Perchlorsäure und 1 ml H<sub>2</sub>O gewaschen und mit 500 µl 75 % Acetonitril, 25 0,04% Perchlorsäure eluiert. Die HPLC-Analytik wurde auf einer Reversed Phase C18 Silica Säule mit einem 5-55%igen Acetonitril Gradienten mit 0,04% Perchlorsäure durchgeführt.

Die Konzentrationen des Inhibitors in den jeweils untersuchten Gewebetypen (µg/g) sowie in Blutplasma und Galle (µg/ml) und zum Vergleich eines 30 entsprechenden Naphthylsulfonylderivats sind in der nachfolgenden Tabelle dargestellt.

- 27 -

Tabelle

Verteilungsprofil einer erfindungsgemäßen Substanz in verschiedenen Geweben bzw. Blutplasma und Galle im Vergleich zu einem Naphthylsulfonyl-Derivat ( $\text{Na-2-Naphthylsulfonyl-3-amidinophenylalanin-4-ethoxycarbonyl-piperazid}$ )

5

10

15

20

25

Gewebe	Gehalt ( $\mu\text{g/g}$ )		
	uPA-Inhibitor 1 mg/kg i.p. 5 Tage	uPA-Inhibitor 1 mg/kg i.p. 10 Tage	Naphthylsulfonyl- Drivat 1 mg/kg i.p., 5 Tage
Milz	2,02	2,48	0,089
Leber	2,85	2,08	0,12
Niere	2,67	2,48	0,085
Muskel	0,74	< 0,5	0,008
Fett Niere	0,82	1,0	< 0,005
Herz	< 0,5	1,09	0,59
Lunge	3,70	1,81	0,020
Gehirn	< 0,5	< 0,5	
Lymphknoten Trachea	7,45	16,38	0,12
Lymphknoten Achsel	1,97	2,74	< 0,005
Lymphknoten Knie	7,83	3,8	< 0,005
Gehalt ( $\mu\text{g/ml}$ )			
Plasma	0,008	0,035	0,004
Galle	1,96	1,75	0,097

30

In den meisten untersuchten Gewebetypen lag nach 5 bis 10 Tagen der Inhibitor in einer Größenordnung von 1 bis 3  $\mu\text{g/g}$  vor. Die Plasmakonzentrationen des Inhibitors lagen 24 h nach der jeweils letzten i.p. Applikation jeweils ein bis zwei Größenordnungen unter den mittleren Gewebekonzen-

- 28 -

trationen. Daraus kann auf eine hohe Affinität für Gewebe und eine niedrige Plasmainweißbindung geschlossen werden. Die Konzentrationen des im Vergleich über 5 Tage applizierten Naphthylsulfonyl-Derivats waren in den verschiedenen Geweben 20-30 fach geringer.

5

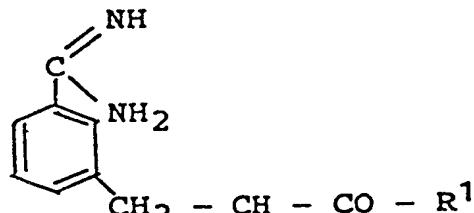
Der Inhibitor zeigt eine auffallende Anreicherung in den Lymphknoten. In den unabhängigen Versuchen wurden in trachealen Lymphknoten nach 5-tägiger Applikation Konzentrationen 5,3 bzw. 7,5  $\mu$ g/g, nach 10-tägiger Applikation 21,6 bzw. 16,4  $\mu$ g/g gemessen. Da Tumorzellen sich regelmäßig über lymphatische Bahnen disseminieren, ist die spezifische Anreicherung des Inhibitors in den Lymphgefäß en von Bedeutung und Vorteil für dessen Einsatz als anti-metastatisches Therapeutikum.

10

## Ansprüche

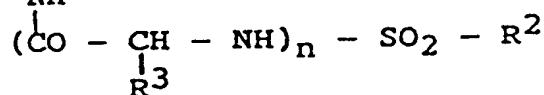
## 1. Verwendung von Verbindungen der Formel I

5



I

10



die als Racemate sowie als D- oder L-konfigurierte Verbindungen vorliegen und in denen

15

R1 (a) OH oder OR<sup>4</sup> ist, wobei R<sup>4</sup> ein gegebenenfalls substituiertes, verzweigtes oder unverzweigtes C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>-Alkyl, C<sub>3</sub>-C<sub>8</sub>-Cycloalkyl oder Aralkyl ist,

(b) eine Gruppe der Formel  $\begin{array}{c} R^5 \\ \diagup \\ -N \\ \diagdown \\ R^6 \end{array}$  darstellt, in welcher R<sup>5</sup>

20

und R<sup>6</sup> beliebige Reste sind, wobei insbesondere

(i) R<sup>5</sup> und R<sup>6</sup> H sind,

(ii) R<sup>5</sup> H ist und R<sup>6</sup> ein gegebenenfalls substituiertes verzweigtes oder unverzweigtes C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>-Alkyl, Aralkyl, oder C<sub>5</sub>-C<sub>8</sub> Cycloalkyl ist,

(iii) R<sup>5</sup> und R<sup>6</sup> jeweils unabhängig ein gegebenenfalls substituiertes, unverzweigtes oder verzweigtes C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub> Alkyl sind oder

(iv) R<sup>5</sup> H ist und R<sup>6</sup> -NH<sub>2</sub> oder eine insbesondere mit Aryl oder Heteroaryl substituierte Aminogruppe ist,

25

30

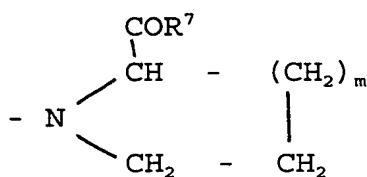
- 30 -

(v)  $R^5$  H oder ein gegebenenfalls substituiertes, unverzweigtes oder verzweigtes  $C_1$ - $C_4$  Alkyl ist oder  $R^6$  der Rest einer Aminosäure, eines Peptids oder eines Polypeptids ist,

5

(c) eine Gruppe der Formel

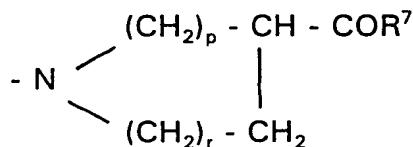
10



darstellt, in welcher m die Zahl 1 oder 2 bezeichnet, und in welcher eine oder mehrere der Methylengruppen gegebenenfalls substituiert sind, wobei die Gruppe (c) racemisch oder D- bzw. L-konfiguriert ist, und R<sup>7</sup> die Bedeutung von R<sup>1</sup> in den Ziffern (a), (b) und (f) aufweist.

(d) eine Gruppe der Formel

20



25

darstellt, in welcher  $p = r = 1$ ,  $p = 1$  und  $r = 2$  oder  $p = 2$  und  $r = 1$  sind und in welcher eine oder mehrere der Methylengruppen gegebenenfalls substituiert sind, und  $R^7$  die Bedeutung von  $R^1$  in Ziffer (a), (b) und (f) aufweist.

30

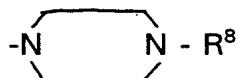
(e) eine Piperidylgruppe darstellt, die gegebenenfalls in einer der Stellungen 2, 3 und 4 substituiert ist,

- 31 -

wobei gegebenenfalls an die heterocycloaliphatischen Ringe der Formeln (c), (d), (e) ein weiterer aromatischer oder cycloaliphatischer Ring in 2,3 oder 3,4 Stellung, bezogen auf das Heteroatom, ankondensiert ist,

5

(f) eine Gruppe der Formel



10 darstellt, in welcher R<sup>8</sup>

- (i) einen gegebenenfalls substituierten C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>-Alkyl- oder Arylrest,
- (ii) einen gesättigten oder ungesättigten, verzweigten oder unverzweigten C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>-Alkoxyrest oder
- (iii) einen gegebenenfalls substituierten Phenoxy- bzw. Benzyloxycarbonylrest bedeutet,

15

(g) einen Acylrest der Formel -COX darstellt, wobei X

- (i) H, einen gegebenenfalls substituierten unverzweigten oder verzweigten Alkylrest,
- (ii) einen gegebenenfalls substituierten Aryl- oder Heteroarylrest, oder
- (iii) einen gegebenenfalls substituierten Cycloalkylrest bedeutet,

20

25 (h) einen Aralkylrest darstellt, in dem der aromatische Rest gegebenenfalls substituiert ist,

30

(i) einen Carbonsäureamidrest der Formel -CONR'R", einen Thiocarbonsäureamidrest -CSNR'R" oder einen Essigsäureamidrest -CH<sub>2</sub>-CONR'R" darstellt, wobei

- (i) R' und R" H sind,

- 32 -

(ii) R' und R" jeweils unabhängig C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>-Alkyl sind,  
(iii) R' H ist und R" C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>-Alkyl ist,  
(iv) R' H ist und R" Aryl ist, oder  
(v) R' und R" mit dem Stickstoffatom einen hetero-  
5 cycloaliphatischen Ring mit 5-7 Ringgliedern, der  
ein weiteres Heteroatom tragen kann, bilden,

(j) einen SO<sub>2</sub>-Y-Rest darstellt, in dem Y  
(i) ein gegebenenfalls substituiertes C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>-Alkyl,  
10 (ii) ein gegebenenfalls substituiertes Aryl oder Heteroaryl bzw. O-Aryl oder O-Heteroaryl, oder  
(iii) -NR'R" ist, wobei R' und R" jeweils unabhängig H oder C<sub>1</sub>-C<sub>3</sub>-Alkyl bedeuten,

15 (k) einen cycloaliphatischen Ring mit 5 bis 8 C-Atomen darstellt, der gegebenenfalls substituiert ist,

(l) einen gegebenenfalls substituierten Heteroarylrest oder heterocycloaliphatischen Rest darstellt,

20 (m) einen funktionalisierten Alkylrest der Formel -(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>-X darstellt, wobei die Alkylkette unverzweigt oder verzweigt ist, n = 1 bis 8 bedeutet und der funktionelle Rest X  
25 (i) eine Hydroxylgruppe darstellt, deren H-Atom gegebenenfalls durch eine C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>-Alkyl-, Aralkyl-, z.B. Benzyl oder Phenylethyl, Aryl-, C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>-Hydroxyalkyl- oder Acylgruppe CO-Alkyl (C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>), substituiert ist,  
(ii) ein Halogenatom bedeutet,  
(iii) eine tertiäre Aminogruppe der Formel -N(Alk)<sub>2</sub>  
30 darstellt, wobei die Alkylgruppen 1 bis 3 C-

- 33 -

Atome besitzen und das Stickstoffatom gegebenenfalls einem heterocycloaliphatischen Ring mit 5-7 Ringgliedern, der ein weiteres Heteroatom, S tragen kann, angehört,

5

$R^2$  einen gegebenenfalls substituierten Phenylrest darstellt,

$R^3$  H oder verzweigtes bzw. unverzweigtes  $C_1$ - $C_4$ -Alkyl ist und n 0 oder 1 bedeutet.

10

oder von Salzen der Verbindungen zur Herstellung eines Mittels für die Diagnostik, Therapie und Prävention von Urokinase- oder Urokinasezeptor-assoziierten Krankheiten.

15

2. Verwendung nach Anspruch 1,  
dadurch gekennzeichnet,  
daß  $R^1$  eine Gruppe der Formeln (b), (d) und (f) ist,  $R^2$  einen 2,4,6-Triisopropylphenyl-Rest darstellt, und n=0 ist.

20

3. Verwendung nach Ansprüchen 1 oder 2,  
dadurch gekennzeichnet,  
daß die Verbindung der Formel I Na-(2,4,6-Triisopropyl-phenylsulfonyl)-3-amidino-(D,L)-phenylalanin-4-ethoxycarbonyl-piperazid, das L-Enantiomer oder ein pharmazeutisch verträgliches Salz einer der Verbindungen ist.

25

4. Verwendung nach einem der Ansprüche 1 bis 3,  
dadurch gekennzeichnet,  
daß die Verbindungen in Form von physiologisch verträglichen Säuresalzen, insbesondere als Hydrochloride, vorliegen.

30

- 34 -

5. Verwendung nach einem der Ansprüche 1 bis 4 zur Tumorbekämpfung.
6. Verwendung nach Anspruch 5 zur Bekämpfung von Mammakarzino-  
5 men, Pankreaskarzinomen und der Metastasenbildung.
7. Verwendung nach einem der Ansprüche 1 bis 4 zur Bekämpfung von  
Pemphigus vulgaris.
- 10 8. Verwendung nach einem der Ansprüche 1 bis 7,  
dadurch gekennzeichnet,  
daß die Verbindungen der Formel I als Konjugate mit weiteren  
pharmakologisch wirksamen Substanzen eingesetzt werden.
- 15 9. Verwendung nach Anspruch 8,  
dadurch gekennzeichnet,  
daß die Verbindungen als Konjugate mit Radiomarkierungen oder mit  
zytotoxischen Substanzen eingesetzt werden.
- 20 10. Verwendung von Verbindungen der Formel II  
$$X-R^2$$

worin

X einen beliebigen Rest darstellt und

R<sup>2</sup> einen gegebenenfalls substituierten Phenylrest darstellt,

25 oder von Salzen dieser Verbindungen zur Herstellung eines Mittels für  
das Targeting von Lymphzellen.
11. Verwendung nach Anspruch 10, worin R<sup>2</sup> ein 2,4,6-dreifach  
substituierter Phenylrest, insbesondere 2,4,6-Triisopropyl ist.
- 30 12. Verwendung nach Anspruch 10 oder 11 zur Diagnostik und Behand-  
lung von Erkrankungen des Lymphgewebes.

- 35 -

13. Verwendung nach einem der Ansprüche 10 bis 12 zur Bekämpfung von Lymphomen und der Metastasenbildung.
14. Verwendung nach einem der Ansprüche 1 bis 13 zur Herstellung von  
5 oral, topisch, rektal oder parenteral verabreichbaren Arzneimitteln.
15. Verwendung nach einem der Ansprüche 1 bis 14 in Form von  
Tabletten, Dragees, Kapseln, Pellets, Suppositorien, Lösungen oder  
transdermalen Systemen, wie Pflastern.  
10
16. Verfahren zur Urokinasehemmung bei Lebewesen, insbesondere beim  
Menschen, durch Verabreichung einer wirksamen Menge mindestens  
eines Urokinaseinhibitors nach einem der Ansprüche 1 bis 4.
- 15 17. Verfahren zum Targeting des Lymphgewebes bei Lebewesen, ins-  
besondere beim Menschen, durch Verabreichung einer wirksamen  
Menge mindestens einer Verbindung nach einem der Ansprüche 10  
bis 11.
- 20 18.  $\text{N}^{\alpha}-(2,4,6\text{-Triisopropyl-phenylsulfonyl})\text{-3-amidino-(D,L)-phenylalanin-4-}$   
ethoxycarbonyl-piperazid, das L-Enantioner davon oder ein pharma-  
zeutisch verträgliches Salz einer der Verbindungen.

Fig 1

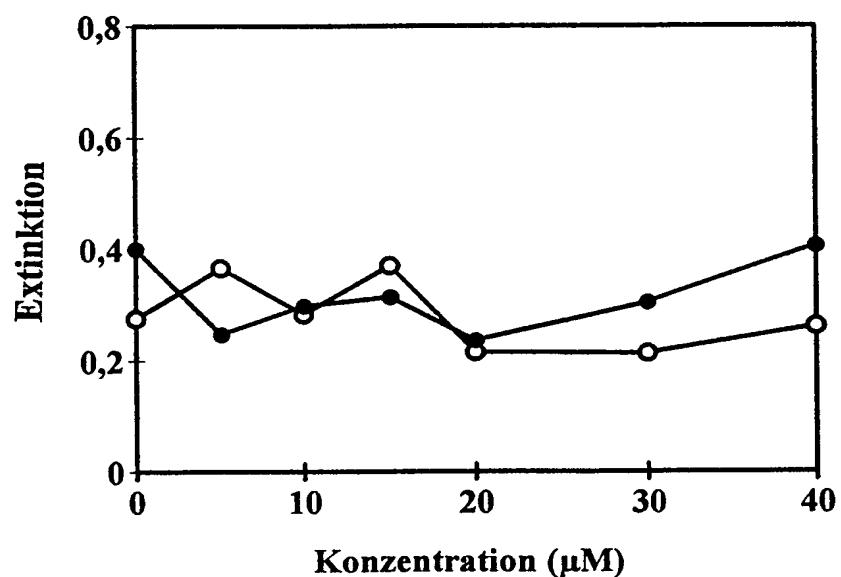


Fig 2

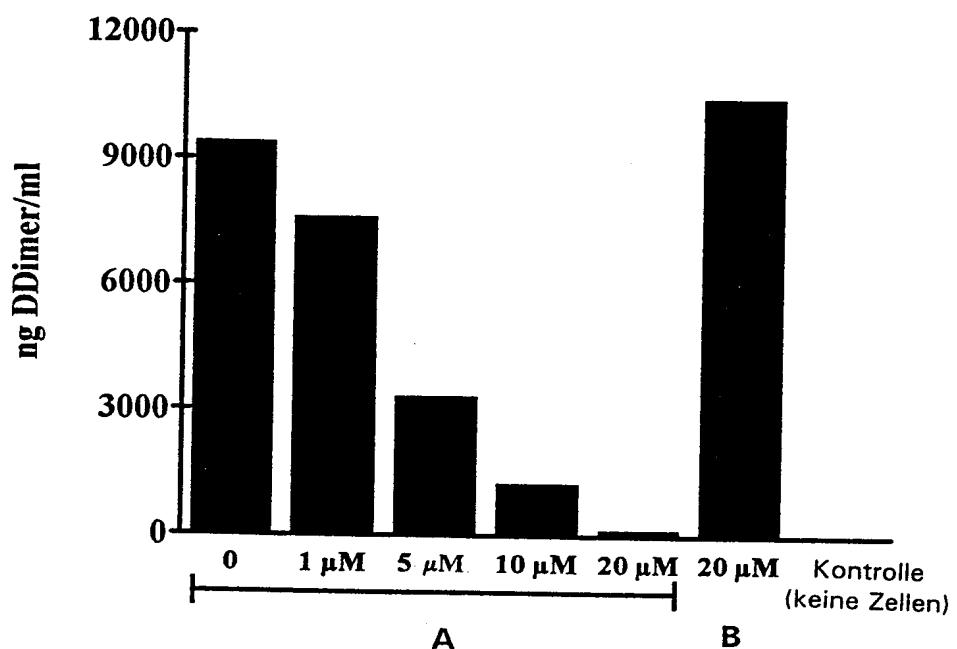


Fig 3

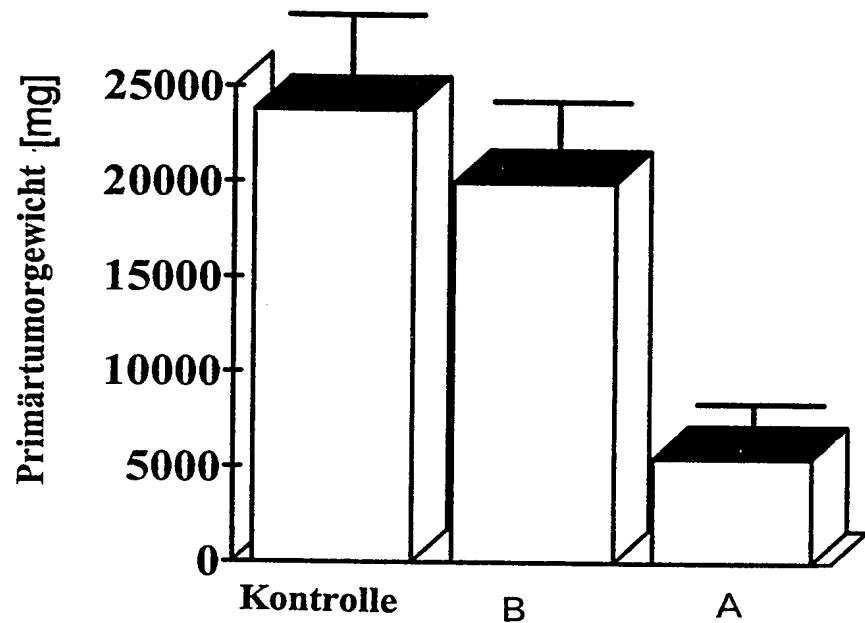


Fig 4

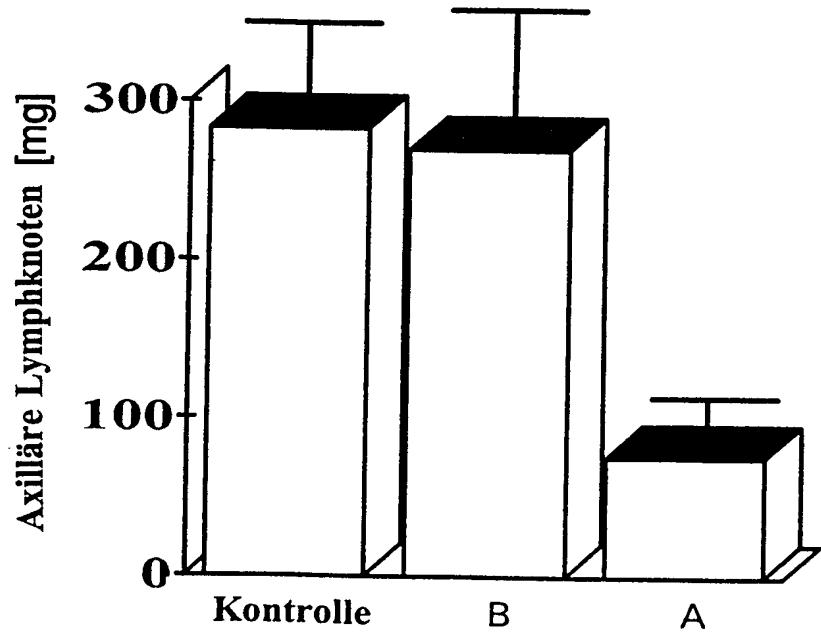


Fig 5

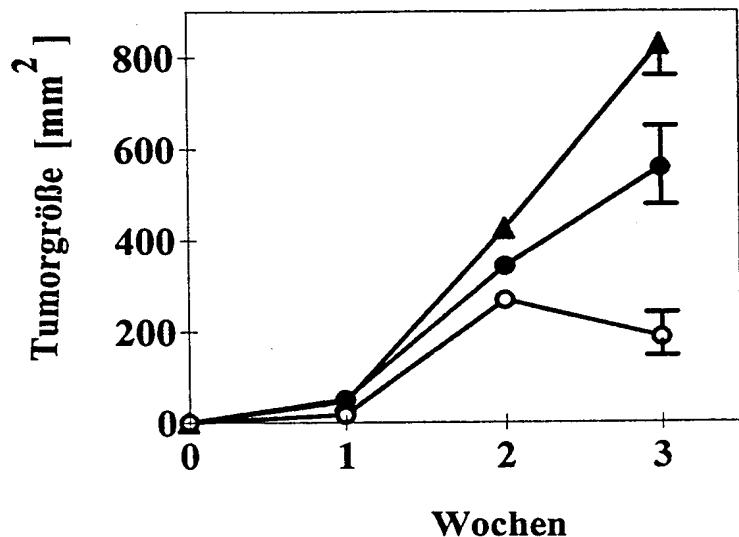


Fig 6

